

受付番号	662-22-E-0290
試験番号	910290

## 試 験 報 告 書

メサラジンの *Raphidocelis subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

2023 年 3 月

一般財団法人化学物質評価研究機構  
久留米事業所

## 目 次

総頁数 35

1. 表 題 .....	4
2. 試験委託者 .....	4
3. 試験施設 .....	4
4. 試験目的 .....	4
5. 試験法 .....	4
6. 試験日程 .....	4
7. 要 約 .....	5
8. 試験材料 .....	6
8.1 被験物質 .....	6
8.2 試験生物 .....	7
9. 試験の実施 .....	7
9.1 培 地 .....	7
9.2 試験器具及び装置 .....	7
9.3 試験液の調製法 .....	7
9.4 試験条件 .....	8
9.5 観察及び測定 .....	8
9.6 結果の算出 .....	9
9.7 試験の有効性 .....	10
9.8 数値の取扱い .....	10
10. 試験結果及び考察 .....	10
10.1 試験液の観察及び測定結果 .....	10
10.2 $E_rC_{50}$ .....	10
10.3 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及び NOEC .....	11
10.4 試験の有効性 .....	11
10.5 考 察 .....	11
11. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 .....	11

Table 1	pH of test solutions.....	12
Table 2	Culture temperature and light intensity in incubator.....	12
Table 3	Value of biomass at each time .....	13
Table 4	Growth rate and growth inhibition rate .....	14
Table 5	E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> and NOEC.....	15
Table 6	Result of statistical analysis .....	15
Table 7	Variation of growth rates in control.....	15
Figure 1	Concentration-response curve.....	16
Figure 2	Growth curve.....	17
Appendix 1	被験物質濃度の測定方法及び結果	
Appendix 2	検量線及びクロマトグラム	
Additional data	予備試験結果	

## 1. 表 題

メサラジンの *Raphidocelis subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

## 2. 試験委託者

名 称 環境省大臣官房環境保健部環境安全課

所在地 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

## 3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

所在地 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

## 4. 試験目的

メサラジンの *Raphidocelis subcapitata* に対する生長阻害試験を行い、0-72 時間の 50%生長阻害濃度 (EC<sub>50</sub>) 及び最大無影響濃度 (NOEC) を求める。

## 5. 試験法

「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号；最終改正 令和 2 年 11 月 5 日、薬生発 1105 第 2 号、20201015 製局第 1 号、環保企発第 2011055 号) に定める「藻類生長阻害試験」

## 6. 試験日程

試 験 開 始 日	2023 年 1 月 20 日
実 験 開 始 日	2023 年 1 月 23 日
実 験 終 了 日	2023 年 1 月 26 日
試 験 終 了 日	2023 年 3 月 6 日

## 7. 要 約

被験物質

メサラジン

試験目的

メサラジンの *Raphidocelis subcapitata* に対する生長阻害試験を行い、0-72 時間の 50%生長阻害濃度 (EC<sub>50</sub>) 及び最大無影響濃度 (NOEC) を求める。

試験法

「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環境企発第 110331009 号；最終改正 令和 2 年 11 月 5 日、薬生発 1105 第 2 号、20201015 製局第 1 号、環境企発第 2011055 号) に定める「藻類生長阻害試験」

試験条件

試験生物	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
試験区	設定濃度として 100、50.0、25.0、12.5、6.25 mg/L (公比 2.0) の 5 濃度区及び対照区
試験液の調製	100 mg/L (設定) になるように供試試料と培地を混合し、溶解するまで攪拌して試験原液を調製した。この試験原液をそのまま若しくは培地で適宜希釈し、試験液を調製した。
暴露方式	旋回振とう培養 (約 100 回/分)
暴露期間	72 時間
連 数	6 連/対照区 (バックグラウンド測定用に 1 試験容器を別途設定) 3 連/試験濃度区 (バックグラウンド測定用に 1 試験容器を別途設定)
試験液量	600 mL/対照区 (100 mL/試験容器) 300 mL/試験濃度区 (100 mL/試験容器) (バックグラウンド測定用に 100 mL/対照区及び試験濃度区を別途設定)
培養温度	22.2～22.3℃
光強度	89～91 μmol/m <sup>2</sup> /s
生物量の測定	クロロフィル蛍光値
被験物質濃度の測定	LC-MS/MS 法 (暴露開始時及び終了時)

試験結果

EC <sub>50</sub> (E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> )	>100 mg/L
NOEC (生長速度 0-3d)	12.5 mg/L
(EC <sub>50</sub> 及び NOEC は、設定濃度に基づく値)	

## 8. 試験材料

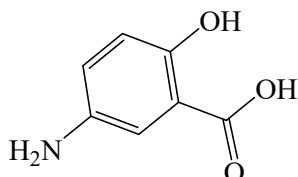
## 8.1 被験物質

## a) 名称等

名 称	メサラジン
別 名	メサラミン、5-アミノサリチル酸
CAS 番号	89-57-6

## b) 構造式等

構造式

分子式  $C_7H_7NO_3$ 

分子量 153.14

## c) 供試試料

被験物質純度	98%
供給者	富士フイルム和光純薬株式会社
ロット番号	TPK9174

被験物質の純度は 100% として取り扱った。

## d) 物理化学的性状

外観 うすい褐色の粉末

## e) 保管条件

室温暗所保管した。

## f) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。

## 8.2 試験生物

種	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
生物種選択の理由	テストガイドラインに推奨されている種
入手源	American Type Culture Collection
入手株番号	ATCC 22662
入手日	1995 年 6 月 30 日
入手後の管理	当試験施設で無菌的に継代培養
試験系の再現性の確認	定期的に基準物質による藻類生長阻害試験を実施 最新のデータを以下に示す。 基準物質：二クロム酸カリウム (試薬特級, ロット番号 YLF7267, 富士フイルム 和光純薬) 実施期間：2023 年 2 月 13 日～2 月 16 日 E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> (0-3d) : 1.4 mg/L この値は当試験施設におけるバックグラウンドデータの規定 範囲内 [平均±2×標準偏差: 0.99～1.5 mg/L (n=12)] であった。

## 9. 試験の実施

## 9.1 培 地

前培養及び試験共に精製水で調製した OECD 培地 (OECD TG 201 ; March 23, 2006) を用いた。

Component	mg/L	Component	mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.185	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00001
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.415	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	18.0
ZnCl <sub>2</sub>	0.00300	NH <sub>4</sub> Cl	15.0
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0640	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.60
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.100	NaHCO <sub>3</sub>	50.0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.00150	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00700	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15.0

## 9.2 試験器具及び装置

試験容器	300 mL 容ガラス製三角フラスコ (通気性のシリコセン®付)
培養装置	光照射式恒温振とう培養機 LP-0.7LEDSS (日本医化器械製作所、機器番号 SIN-008)

## 9.3 試験液の調製法

供試試料 0.100 g をひょう量し、培地 1000 mL と混合後、マグネティックスターラーで攪拌し溶解させて 100 mg/L の試験原液を調製した。調製容器内で必要量の試験原液と培地を混合、攪拌して試験液を調製し、各試験容器に分割した。100 mg/L 区については、試験原液をそのまま試験容器に分割した。

## 9.4 試験条件

暴露方式	旋回振とう培養（約 100 回/分）
暴露期間	72 時間
試験濃度	設定濃度として 100、50.0、25.0、12.5、6.25 mg/L（公比 2.0） 予備試験結果から試験濃度及び公比を決定した。 予備試験結果を Additional data に示す。
対照区	被験物質を含まない培地
連 数	6 連/対照区（バックグラウンド測定用に 1 試験容器を別途設定） 3 連/試験濃度区（バックグラウンド測定用に 1 試験容器を別途設定）
試験液量	600 mL/対照区（100 mL/試験容器） 300 mL/試験濃度区（100 mL/試験容器） （バックグラウンド測定用に 100 mL/対照区及び試験濃度区を別途設定）
暴露開始時の細胞数	本試験と同様の条件で 2023 年 1 月 20 日～2023 年 1 月 23 日まで 3 日間前培養した藻類の細胞数を計数し、試験液中の細胞濃度が $0.50 \times 10^4$ cells/mL になるように試験液に接種した。前培養については使用前に細胞の状態を観察し、変形や異常な形態の細胞が無いことを確認した。
測定機器	コールターカウンター Z2（ベックマン・コールター、機器番号 CC-006）
試験操作	無菌操作により実施した（暴露終了時は除外）。
温 度	21～24℃の範囲内で設定し、変動は設定値 $\pm 2^\circ\text{C}$ 以内とした。
照 明	400～700 nm の波長領域で設定値 $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ （設定値の $\pm 20\%$ 以内、平均値 $\pm 15\%$ の変動幅）に調整した蛍光灯型 LED による連続照明

## 9.5 観察及び測定

### a) 藻類の生長等

測定項目	生物量（クロロフィル蛍光値）
測定頻度	暴露開始後 24 時間ごと（各試験区においてバックグラウンド測定用に調製した試験容器のブランク値を測定し、ブランク補正を実施）
細胞観察	暴露終了時に各試験区につき 1 試験容器
測定機器	分光蛍光光度計 RF-6000（島津製作所、機器番号 PF-005） 顕微鏡 ECLIPSE Ci-L（ニコン）

### b) 試験液の状態

暴露開始時及び終了時に観察

### c) 試験液の水質及び暴露環境

pH	調製容器より別途分取して測定（暴露開始時） 各試験区につき 1 試験容器を測定（暴露終了時）
培養装置内温度及び光強度	暴露開始時、暴露 1 日後、暴露 2 日後及び暴露終了時に測定



測定機器      pH 計    HM-21P (東亜ディーケーケー)  
                  ガラス製棒状温度計  
                  光量子計    LI-250A (LI-COR)

d) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度      暴露開始時及び終了時  
 採水方法      調製容器より別途分取 (暴露開始時)  
                  各試験区の試験容器から均等量採取し混合 (暴露終了時)  
 藻体除去      遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) (暴露終了時のみ実施)  
 採水量        約 10 mL (暴露開始時：全試験区)  
                  12 mL (暴露終了時：全試験区)  
 測定方法      Appendix 1 参照

## 9.6 結果の算出

暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が設定濃度の 80~120%であったため、結果の算出には設定濃度を用いた。

a) 阻害率の算定法

各試験区の生物量の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を作成した。また、生長速度を比較して阻害率を算出した。

生長速度の比較

指数関数的に増殖しているときの生長速度は次式に従って計算した。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

ここで

$\mu_{i-j}$  =  $t_i$  時から  $t_j$  時までの期間の生長速度。日当たり ( $d^{-1}$ ) で表す。

$X_i$  =  $t_i$  時の生物量。試験開始時 ( $t_0$ ) の生物量は初期細胞濃度に相当する計算値を用いた。

$X_j$  =  $t_j$  時の実測生物量

$t_i$  = 暴露開始後  $i$  回目に生物量を測定した時間 ( $d$ )

$t_j$  = 暴露開始後  $j$  回目に生物量を測定した時間 ( $d$ )

EC<sub>50</sub> 及び NOEC の算出においては、暴露開始時から 72 時間後までの暴露期間を通じた生長速度を求めた。対照区については、試験の有効性を調べるために 1 日ごとの生長速度も求めた。

試験濃度区における生長阻害率は対照区の各連の平均生長速度の平均値 ( $\mu_c$ ) と試験濃度区での各連の平均生長速度 ( $\mu_T$ ) との間の差を次式に従って算出した値 ( $I_\mu$ ) とした。

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100$$

b) EC<sub>50</sub> の算出法

試験濃度範囲で 50%以上の阻害率が得られなかったため、EC<sub>50</sub> は「>試験最高濃度」と表示した。生長速度により求めた EC<sub>50</sub> は ErEC<sub>50</sub> と記載した。

## c) NOEC の評価

生長速度について、Bartlett 法による等分散検定を行った結果、5%有意水準で等分散が認められなかったため、各試験濃度区と対照区について Step-down Jonckheere-Terpstra trend test により有意差検定を行った。有意差検定はエクセル統計（Ver.4.02、社会情報サービス）を用いて実施した。有意差検定結果及び細胞観察結果より、NOEC を評価した。

## 9.7 試験の有効性

- a) 対照区における藻類の生長は 72 時間後に 16 倍以上でなければならない。
- b) 対照区における毎日の生長速度の平均変動係数が暴露期間を通じて 35%を超えてはならない。
- c) 対照区における繰り返し間の生長速度の変動係数が 7%を超えてはならない。

## 9.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 2019 規則 B に従った。

## 10. 試験結果及び考察

## 10.1 試験液の観察及び測定結果

## a) 試験液の状態

試験濃度区では暴露開始時は 100 mg/L 区でごく僅かに淡黄色澄明、その他の濃度区では無色透明であった。暴露終了時には 100 mg/L 区で茶褐色（懸濁物あり）、細胞の増殖により 50.0 mg/L 区でやや緑みがかかった茶褐色、25.0 mg/L 区で緑みがかかった黄色、12.5 mg/L 区で黄色みがかかった緑色、6.25 mg/L 区で緑色を呈していた。

対照区では暴露開始時は無色透明であり、暴露終了時には細胞の増殖により緑色を呈していた。

## b) 試験液の水質及び暴露環境

試験液の pH を Table 1、培養装置内温度及び光強度を Table 2 に示す。

試験液の pH は 6.2～7.8 であった。培養装置内温度は 22.2～22.3℃、光強度は 89～91  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  であった。

## c) 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定方法及び結果を Appendix 1、検量線及びクロマトグラムを Appendix 2 に示す。

測定した試験液中の被験物質濃度は暴露開始時では 6.47～95.1 mg/L、暴露終了時では 5.48～87.7 mg/L であった。また、設定濃度に対してそれぞれ 95.1～104%及び 84.0～87.7%であり、設定濃度の 80～120%以内に保たれていた。

10.2  $E_rC_{50}$ 

各時間での生物量を Table 3、生長速度及び生長阻害率を Table 4、 $E_rC_{50}$  を Table 5 に示す。また、濃度－生長阻害率曲線を Figure 1 に示す。

生長速度によって算出した被験物質の  $E_rC_{50}$  は >100 mg/L であった。

### 10.3 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及び NOEC

NOEC を Table 5、有意差検定結果を Table 6、生長曲線を Figure 2 に示す。

100 mg/L 区では暴露 24 時間後まで、50.0 mg/L 区では暴露 48 時間後まで対数増殖を示したが、それら以降生長は抑えられた。25.0 mg/L 区では暴露 48 時間後まで対数増殖を示したが、それ以降少し生長が抑えられた。12.5 及び 6.25 mg/L 区では対照区と同様の生長を示した。

以下の細胞観察結果は全て対照区との比較に基づくものである。全ての試験濃度区で対照区と同様であり、対照区では異常はみられなかった。

生長速度について有意差検定を行った結果、100、50.0 及び 25.0 mg/L 区において統計学的な有意差が認められた。有意差検定結果及び上記細胞観察結果より、生長速度における NOEC は 12.5 mg/L であった。

### 10.4 試験の有効性

#### a) 対照区における生長

対照区における供試藻類の生長は暴露終了時まで対数増殖を示した (Figure 2 参照)。暴露終了時には初期生物量の 109 倍以上 (Table 3 参照) に増殖し、有効性基準 (16 倍以上の増殖) を満たしていた。

#### b) 対照区における日間生長速度

対照区における日間生長速度の平均変動係数は 3.7% (Table 7 参照) であり、有効性基準 (35%を超えてはならない) を満たしていた。

#### c) 対照区における繰り返し間の生長速度

対照区における繰り返し間の生長速度の変動係数は 0.73% (Table 7 参照) であり、有効性基準 (7%を超えてはならない) を満たしていた。

### 10.5 考 察

試験は被験物質の試験生物に対する影響を求める試験として行った。その結果、 $E_rC_{50}$  は  $>100$  mg/L、NOEC は 12.5 mg/L であった。

また、設定濃度 100 及び 50.0 mg/L 区における暴露開始時の試験液の pH は 6.2 及び 6.5 と僅かに酸性であったが、藻類への影響が懸念されるレベルではないと考えられる<sup>\*1</sup>。

試験液中の被験物質濃度は設定濃度の 80~120%以内に維持され、また、試験環境条件も適切な範囲内であったことから、試験は試験法に準じたものであったと判断される。

\*1: 塩化水素の生長速度に基づく *Raphidocelis subcapitata* への  $E_rC_{50}$  は pH5.3 (0.492 mg/L)、NOEC は pH6.0 (0.097 mg/L) であった (SIDS Initial Assessment Report For SIAM 15: Boston, USA, 22-25<sup>th</sup>, October, 2002)。

### 11. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

当該要因はなかった。

Table 1 pH of test solutions

Nominal concentration (mg/L)	pH	
	At the start	At the end
Control	7.8	7.7
6.25	7.7	7.8
12.5	7.4	7.8
25.0	7.0	7.8
50.0	6.5	7.8
100	6.2	7.7

Table 2 Culture temperature and light intensity in incubator

Time	At the start	1-day	2-day	At the end
Culture temperature (°C)	22.2	22.2	22.3	22.3
Light intensity ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )	89	91	90	90

Table 3 Value of biomass at each time

Nominal concentration (mg/L)	Vessel	Chlorophyll fluorescence value (relative unit)			
		0 hours <sup>a</sup>	24 hours	48 hours	72 hours
Control	A	22	110	510	2500
	B	22	110	560	2600
	C	22	110	510	2600
	D	22	110	540	2500
	E	22	100	510	2400 <sup>b</sup>
	F	22	97	530	2600
	Mean	22	110	530	2500
	S.D.	0	6.9	22	86
6.25	A	22	120	590	2600
	B	22	120	580	2700
	C	22	110	540	2600
	Mean	22	120	570	2600
	S.D.	0	2.6	25	49
12.5	A	22	110	490	2300
	B	22	110	560	2100
	C	22	110	560	2100
	Mean	22	110	540	2200
	S.D.	0	1.3	42	130
25.0	A	22	110	550	1300
	B	22	110	540	1500
	C	22	110	500	1800
	Mean	22	110	530	1500
	S.D.	0	3.0	28	230
50.0	A	22	120	510	700
	B	22	120	490	950
	C	22	120	500	1100
	Mean	22	120	500	910
	S.D.	0	2.0	8.1	200
100	A	22	98	170	290
	B	22	94	170	240
	C	22	94	150	210
	Mean	22	95	160	250
	S.D.	0	2.1	9.2	38

a: The value based on the measured value of pre-culture

b: The minimum cell growth in the control (biomass at the end of exposure/biomass at the start of exposure)

$$2400/22 = 109$$

Table 4 Growth rate and growth inhibition rate

Nominal concentration (mg/L)	Vessel	Growth rate (0-3d)	Growth inhibition rate (%)
Control	A	1.58	-
	B	1.58	-
	C	1.58	-
	D	1.58	-
	E	1.56	-
	F	1.59	-
	Mean	1.58	-
	S.D.	0.0115	-
6.25	A	1.59	-0.77
	B	1.60	-1.2
	C	1.58	-0.43
	Mean	1.59	-0.81
	S.D.	0.00625	0.40
12.5	A	1.55	2.0
	B	1.52	3.9
	C	1.51	4.3
	Mean	1.52	3.4
	S.D.	0.0200	1.3
25.0	A	1.36	14
	B	1.40	11
	C	1.46	7.6
	Mean	1.41	11
	S.D.	0.0492	3.1
50.0	A	1.15	27
	B	1.25	21
	C	1.30	18
	Mean	1.23	22
	S.D.	0.0747	4.7
100	A	0.852	46
	B	0.793	50
	C	0.751	52
	Mean	0.799	49
	S.D.	0.0505	3.2

Table 5  $E_rC_{50}$  and NOEC

$E_rC_{50}$ (mg/L)	NOEC (mg/L)
> 100	12.5

Table 6 Result of statistical analysis

Nominal concentration (mg/L)	Result by Step-down Jonckheere-Terpstra trend test	Statistical procedure
6.25	n.s.	Bartlett's test Step-down Jonckheere-Terpstra trend test
12.5	n.s.	
25.0	**	
50.0	**	
100	**	

n.s. : No significant difference

\*\* : Significant difference ( $p < 0.01$ )

Table 7 Variation of growth rates in control

< Variation for section-by-section specific growth rates in the controls >

Vessel	Mean	Standard deviation	Coefficient of variation (%)	
A	1.58	0.0694	4.4	3.7 (Mean)
B	1.58	0.0572	3.6	
C	1.58	0.0468	3.0	
D	1.58	0.0239	1.5	
E	1.56	0.0322	2.1	
F	1.59	0.119	7.5	

< Variation of average specific growth rates in replicate controls >

	0-3day
Mean	1.58
Standard deviation	0.0115
Coefficient of variation (%)	0.73

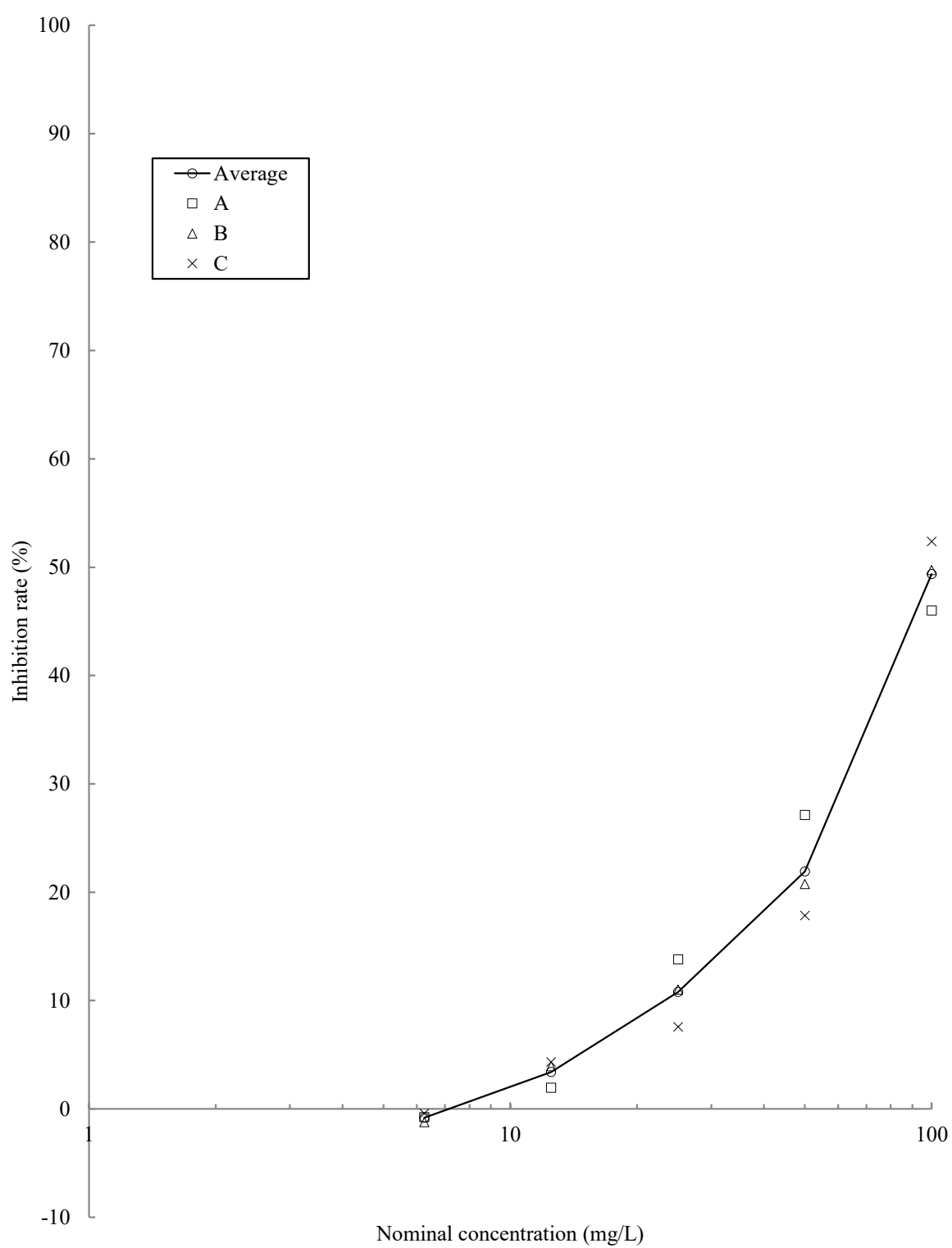


Figure 1 Concentration-response curve.



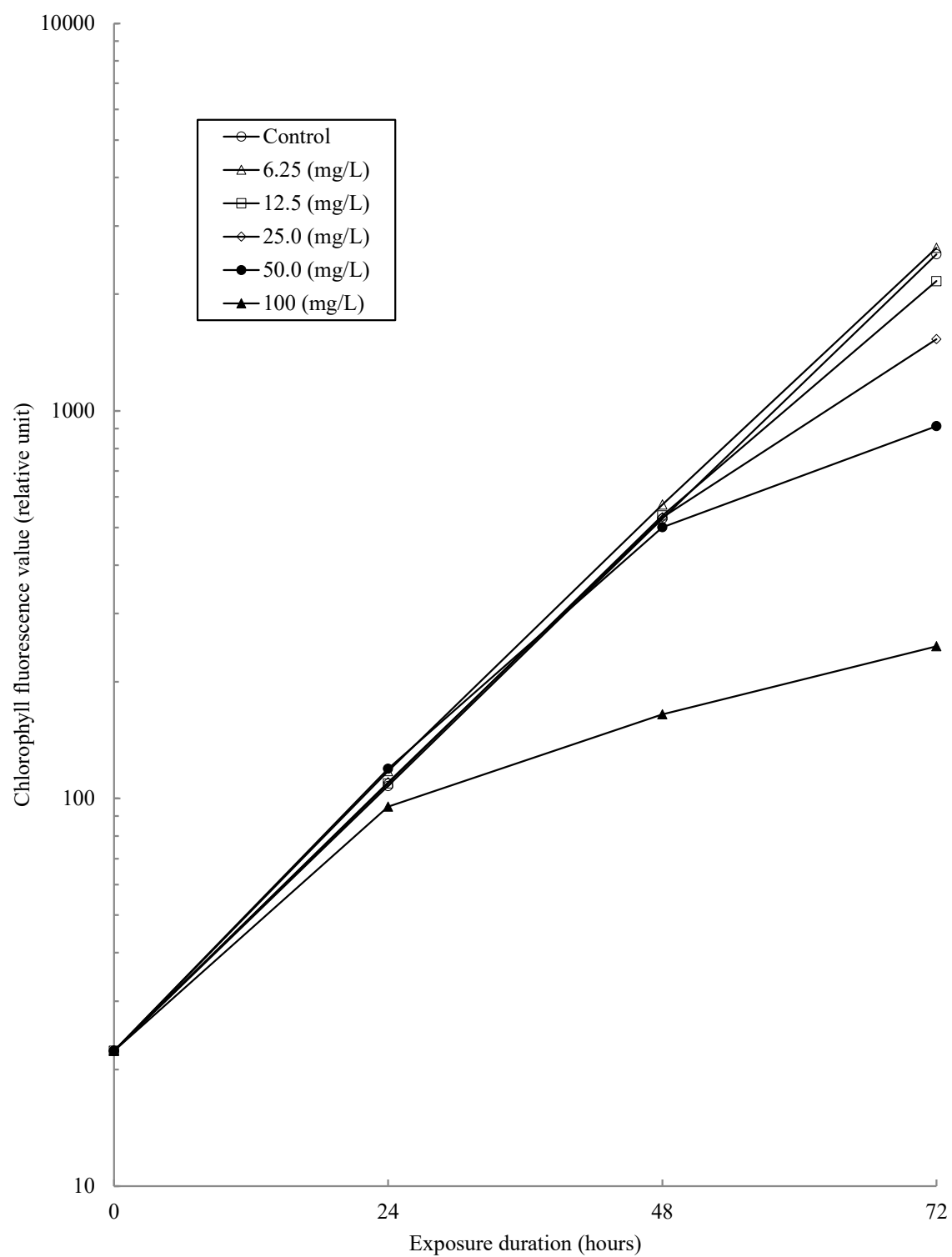


Figure 2 Growth curve.

## Appendix 1

被験物質濃度の測定方法及び結果

## 1. 試験液の前処理法

採取した試験液をそのまま若しくは培地で適宜希釈して、液体クロマトグラフィー—タンデム質量分析法（LC-MS/MS）試料を調製した。

## 2. 被験物質の定量分析

## a) 定量方法

本定量方法の有効性を確認するために、0.0200、0.100、0.200 及び 0.400 mg/L の 4 濃度の標準溶液を用いて検量線（最小二乗法による回帰式： $Y=aX+b$ 、Y：応答量、X：被験物質濃度）を作成した。その結果、クロマトグラム上のピーク面積と濃度により作成した検量線の相関係数  $r$  は 0.995 以上であり、切片  $b$  の絶対値は応答量の最大値の 5%以内であったことから、検量線は原点を通過する直線とみなし、被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った（Appendix figure 2-1-1 及び 2-1-2 参照）。また、LC-MS/MS 試料の分析によって得られたクロマトグラムを Appendix 2 に示す。

試験液中の被験物質の定量下限（LOQ：limit of quantification）は、定量性が確認された範囲での標準溶液の最低濃度（0.0200 mg/L）とした。

## b) 分析条件

機 器

液体クロマトグラフ—質量分析計

[機器番号 LCMS-014 (暴露開始時)]

[機器番号 LCMS-017 (暴露終了時)]

以降の分析条件は LCMS-014、LCMS-017 共通

液体クロマトグラフ	Nexera X2	(島津製作所)
-----------	-----------	---------

質量分析計	LCMS-8060	(島津製作所)
-------	-----------	---------

ソフトウェア	LabSolutions LCMS	(島津製作所)
--------	-------------------	---------

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column2 ODS
-----	---------------

(150 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 5 μm, 化学物質評価研究機構)

カラム温度	40℃
-------	-----

溶離液	A (20%) : 超純水/ぎ酸 (1000/2 v/v)
	B (80%) : メタノール/ぎ酸 (1000/2 v/v)

流 量	0.2 mL/min
-----	------------

注入量	1 μL
-----	------

質量分析計条件

イオン化法                      エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)  
 検出イオン                    正イオン  
 検出法                        選択反応モニタリング (SRM)  
 測定イオン

プリカーサーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン ( <i>m/z</i> )	コリジョンエネルギー (V)
154.1	108.1	-21

インターフェイス温度    300℃  
 DL 温度                      240℃  
 ネブライザーガス流量    1.50 L/min  
 ドライイングガス流量    10.00 L/min

## c) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

供試試料 10.0 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、超音波照射を 1 分間実施し超純水に溶解後、100 mL に定容して、100 mg/L の被験物質溶液を調製した（試験番号:910291 で実施）。これを超純水で希釈して 2.00 mg/L の被験物質溶液を調製した（試験番号:910291 で実施）。これを培地で希釈して 0.200 mg/L の標準溶液を調製した。

LC-MS/MS 試料中の被験物質濃度は、標準溶液及び LC-MS/MS 試料のクロマトグラム上で得られるピーク面積を比較し、比例計算して求めた。

## 3. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下に示す。

Appendix table 1-1 Measured concentration of test item in test solution

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of measured concentration versus nominal concentration %)		
	At the start	At the end	Time-weighted mean
Control	<LOQ	<LOQ	
6.25	6.47 (104)	5.48 (87.7)	5.96 (95.4)
12.5	12.5 (99.9)	10.9 (87.3)	11.7 (93.5)
25.0	24.3 (97.0)	21.6 (86.4)	22.9 (91.6)
50.0	48.3 (96.6)	42.0 (84.0)	45.1 (90.1)
100	95.1 (95.1)	87.7 (87.7)	91.3 (91.3)

LOQ: 0.0200 mg/L

The time-weighted mean is calculated by the following expression:

$$[72 (C_0 - C_{72}) / (\ln C_0 - \ln C_{72})] / 72$$

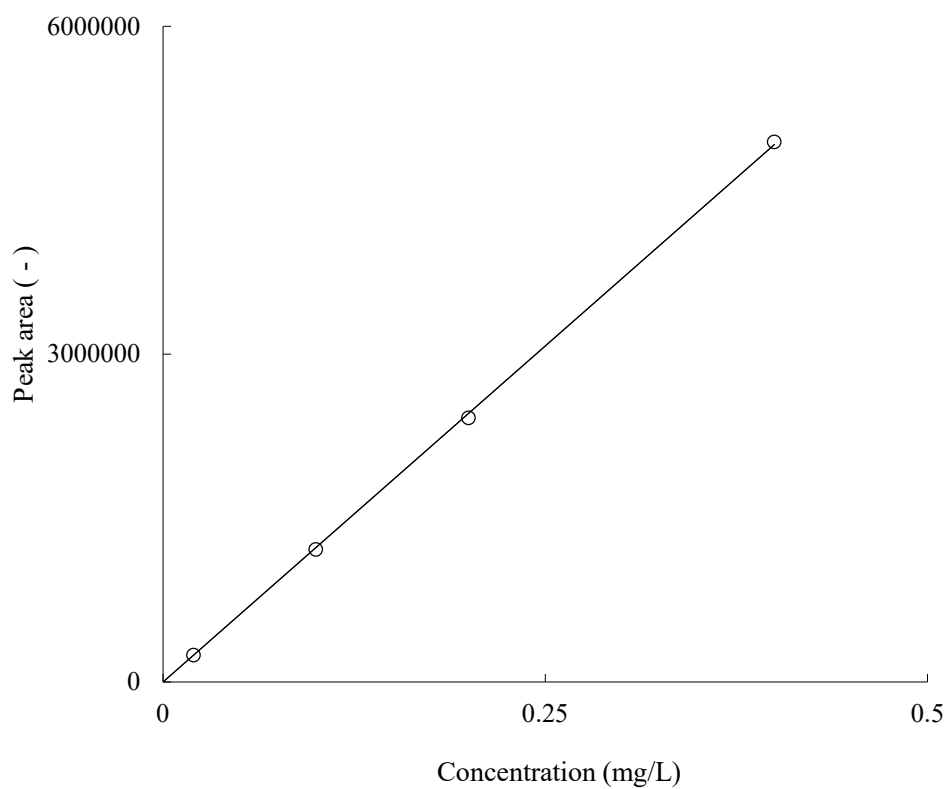
where

$C_n$  : The measured concentration at n hours

$\ln C_n$  : The natural logarithm of  $C_n$

## Appendix 2

検量線及びクロマトグラム

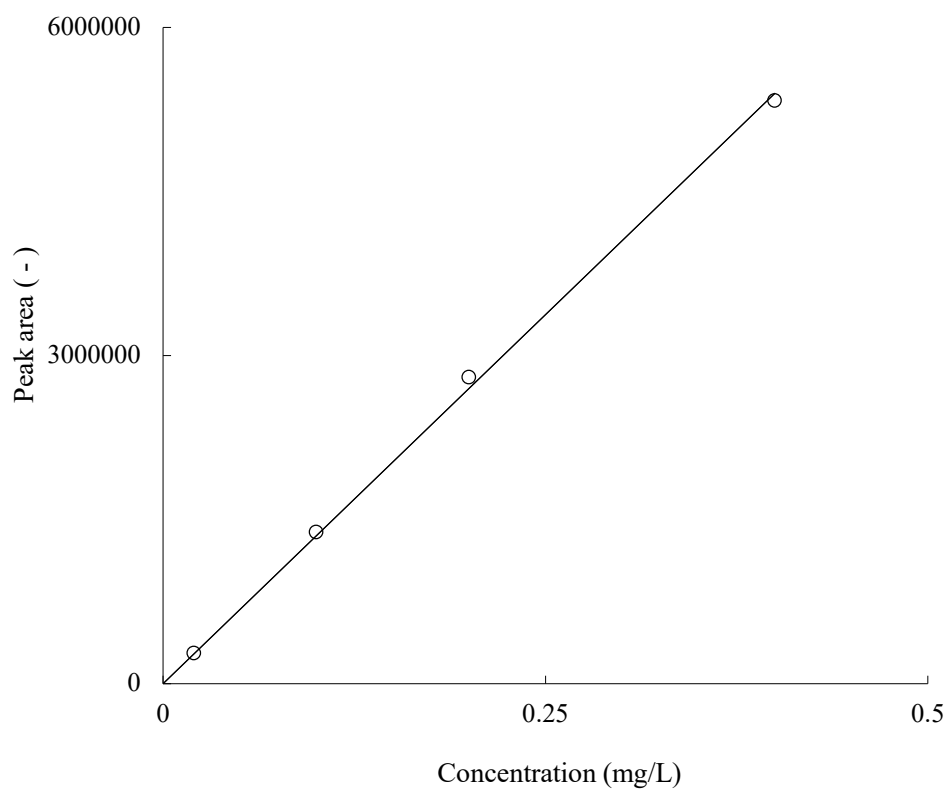


$$y = 12298065x$$

$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area ( - )
0.0200	249283
0.100	1214350
0.200	2418861
0.400	4943300

Appendix figure 2-1-1 Calibration curve of test item for analysis by LC-MS/MS (LCMS-014).



$$y = 13490429x$$

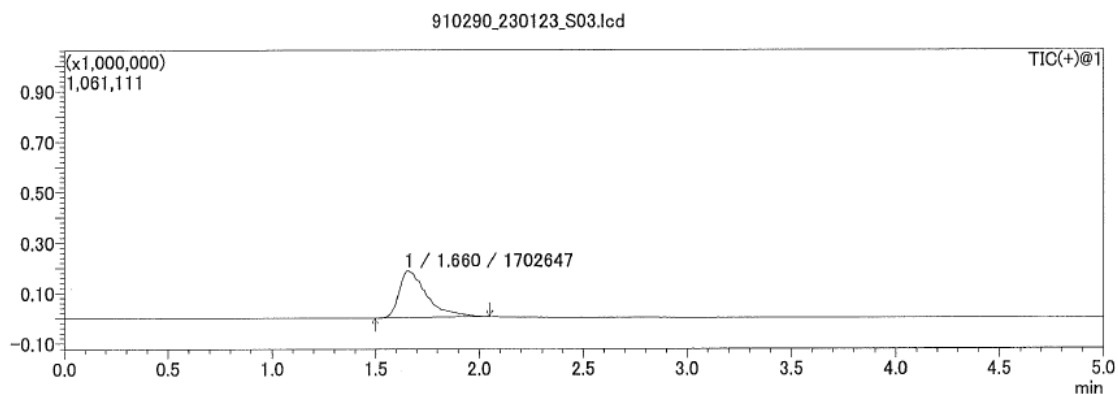
$$r = 0.999$$

Concentration (mg/L)	Peak area ( - )
0.0200	281305
0.100	1386781
0.200	2803688
0.400	5333361

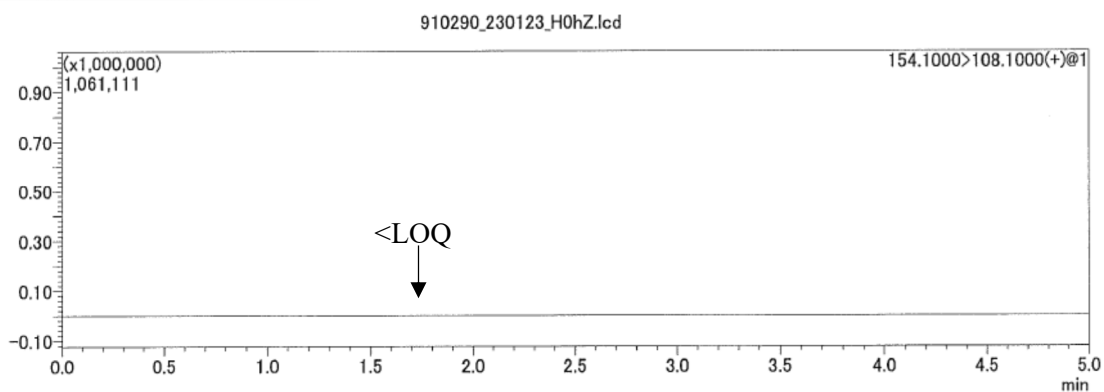
Appendix figure 2-1-2 Calibration curve of test item for analysis by LC-MS/MS (LCMS-017).



Sample ID : 910290  
Sample name : Standard solution 0.200 mg/L  
Vial number : 16  
Acquisition date : 2023/01/23  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230123\_S03.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230120.lcm

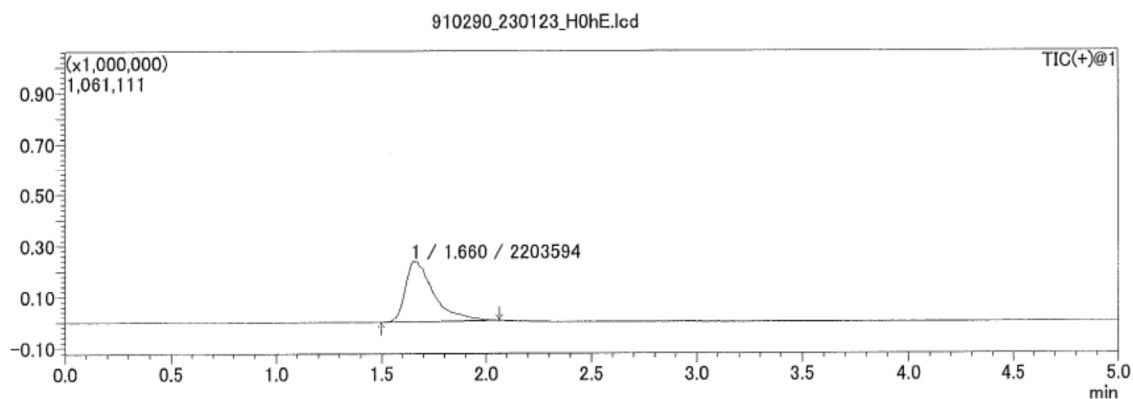


Sample ID : 910290  
Sample name : Control  
Vial number : 17  
Acquisition date : 2023/01/23  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230123\_H0hZ.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230120.lcm

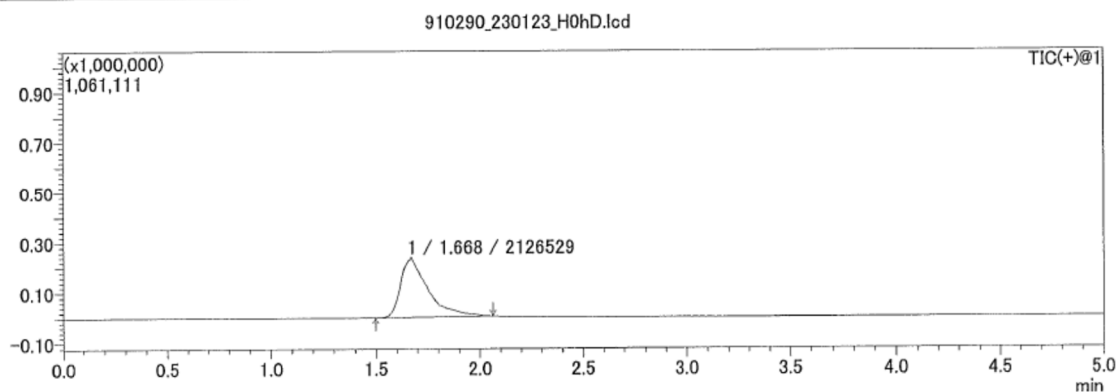


Appendix figure 2-2-1 LC-MS/MS chromatograms at start of exposure.

Sample ID : 910290  
Sample name : 6.25 mg/L exposure level  
Vial number : 18  
Acquisition date : 2023/01/23  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230123\_H0hE.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230120.lcm

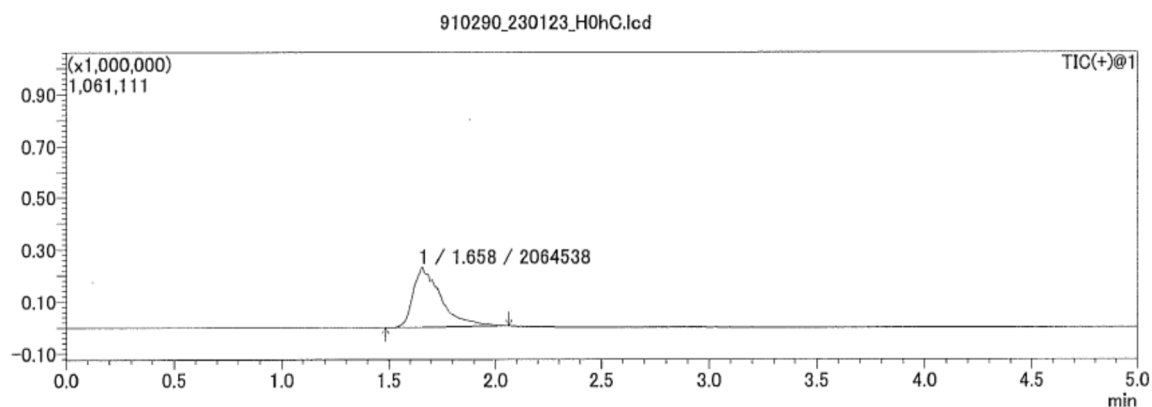


Sample ID : 910290  
Sample name : 12.5 mg/L exposure level  
Vial number : 19  
Acquisition date : 2023/01/23  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230123\_H0hD.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230120.lcm

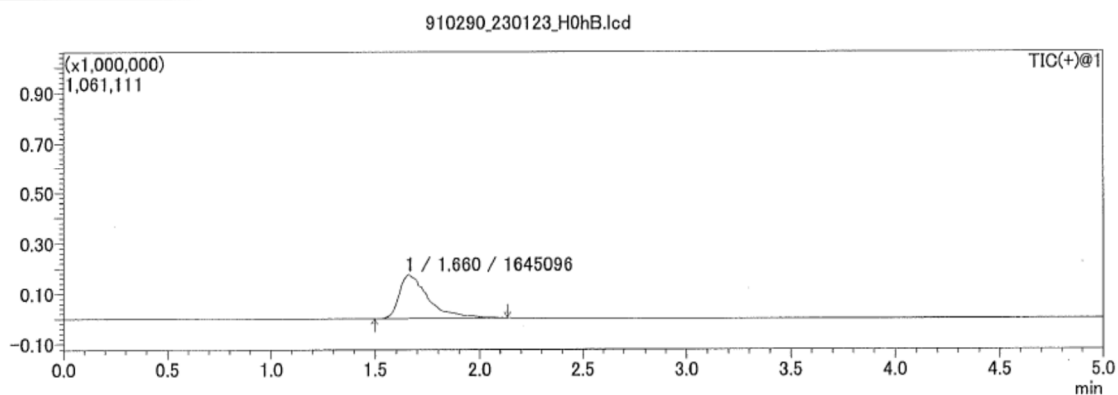


Appendix figure 2-2-2 LC-MS/MS chromatograms at start of exposure.

Sample ID : 910290  
Sample name : 25.0 mg/L exposure level  
Vial number : 20  
Acquisition date : 2023/01/23  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230123\_H0hC.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230120.lcm

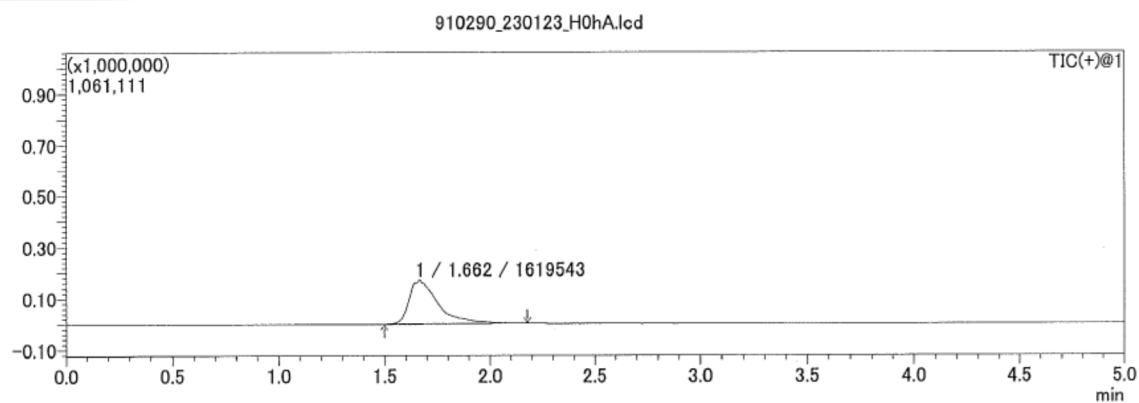


Sample ID : 910290  
Sample name : 50.0 mg/L exposure level  
Vial number : 21  
Acquisition date : 2023/01/23  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230123\_H0hB.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230120.lcm



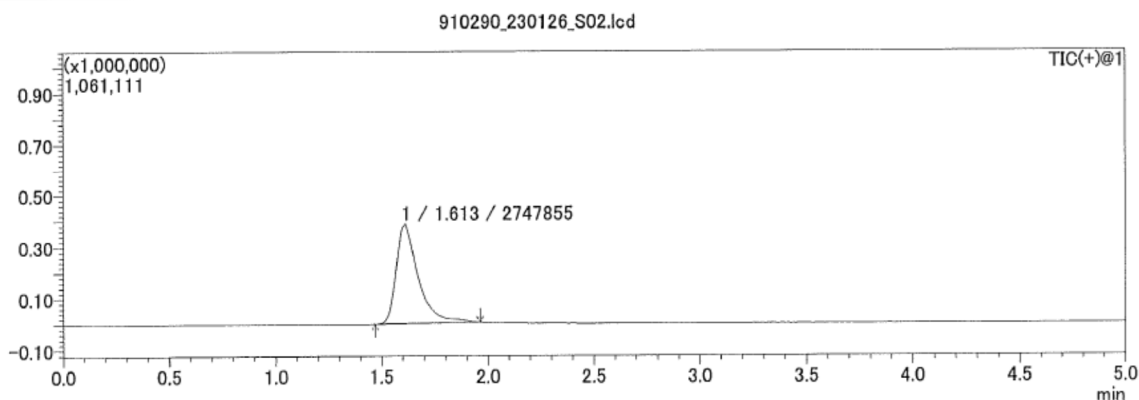
Appendix figure 2-2-3 LC-MS/MS chromatograms at start of exposure.

Sample ID	: 910290
Sample name	: 100 mg/L exposure level
Vial number	: 22
Acquisition date	: 2023/01/23
Inj. Volume	: 1
Data file	: 910290_230123_H0hA.lcd
Method file	: 910290_910292_mrm_230120.lcm

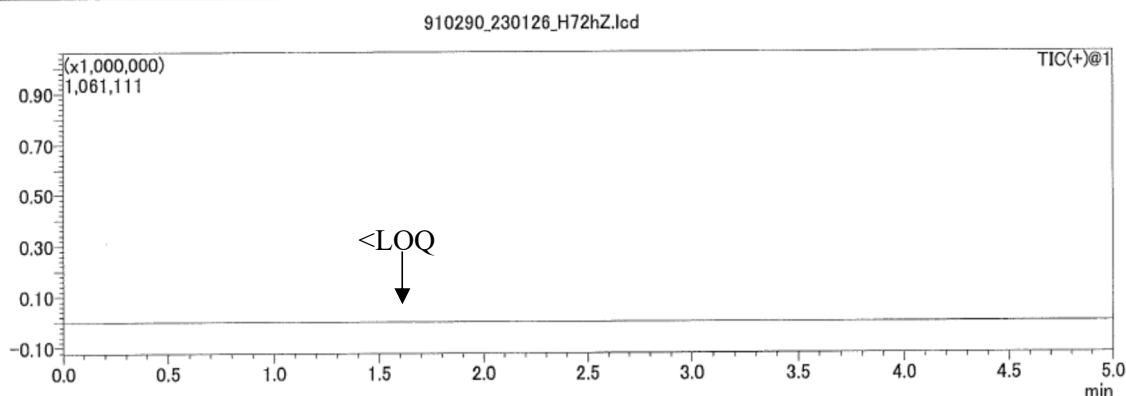


Appendix figure 2-2-4 LC-MS/MS chromatogram at start of exposure.

Sample ID : 910290  
Sample name : Standard solution 0.200 mg/L  
Vial number : 4  
Acquisition date : 2023/01/26  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230126\_S02.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230124MS17.lcm

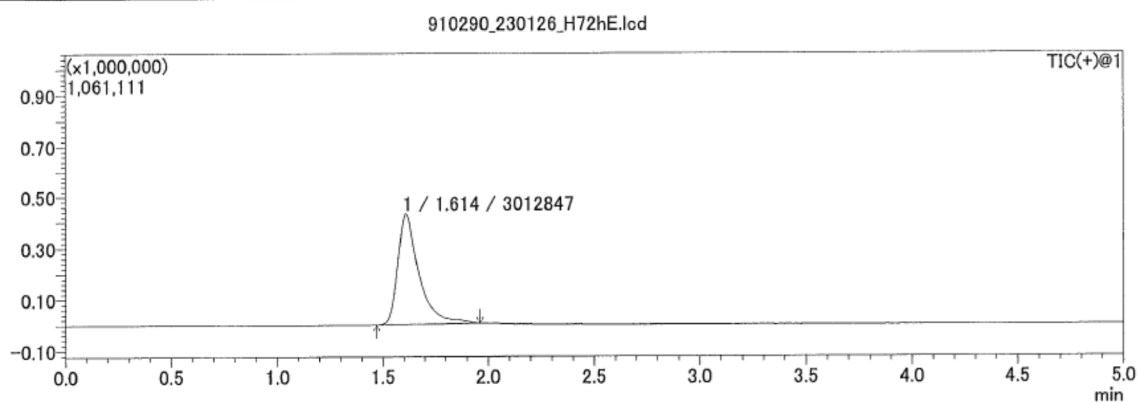


Sample ID : 910290  
Sample name : Control  
Vial number : 6  
Acquisition date : 2023/01/26  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230126\_H72hZ.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230124MS17.lcm

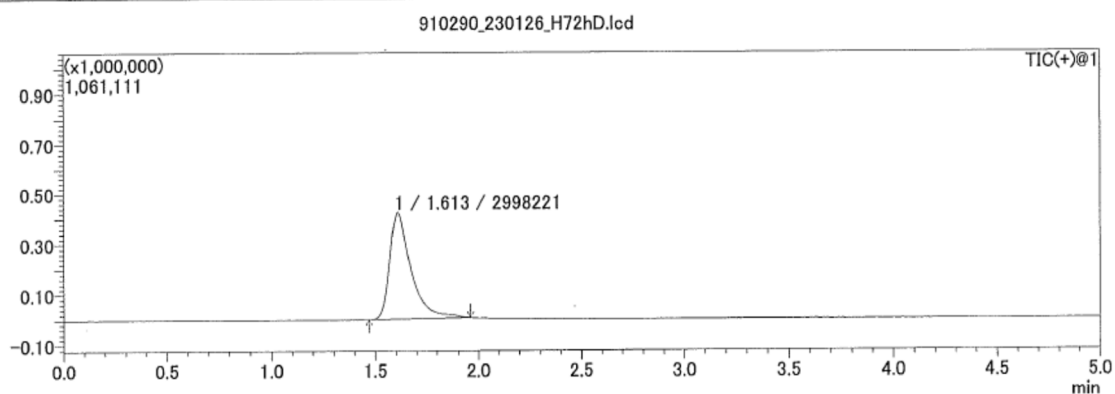


Appendix figure 2-3-1 LC-MS/MS chromatograms at end of exposure.

Sample ID : 910290  
Sample name : 6.25 mg/L exposure level  
Vial number : 7  
Acquisition date : 2023/01/26  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230126\_H72hE.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230124MS17.lcm

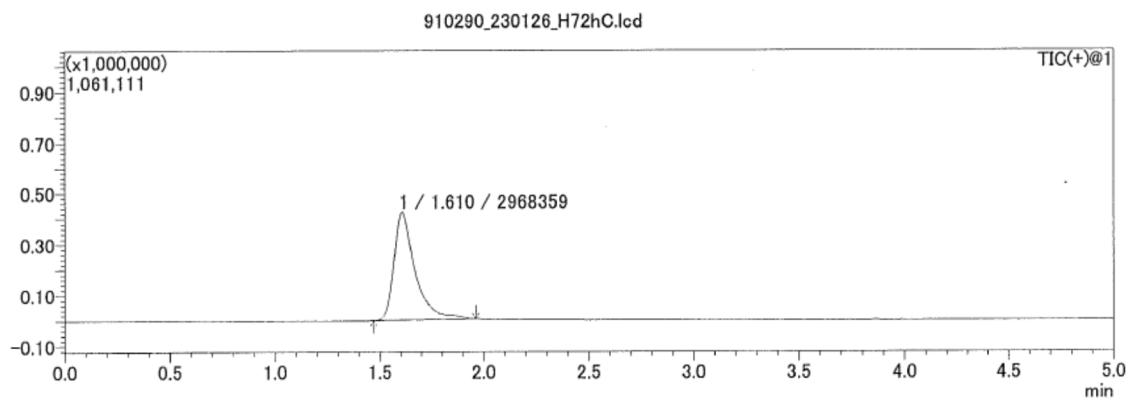


Sample ID : 910290  
Sample name : 12.5 mg/L exposure level  
Vial number : 8  
Acquisition date : 2023/01/26  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230126\_H72hD.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230124MS17.lcm

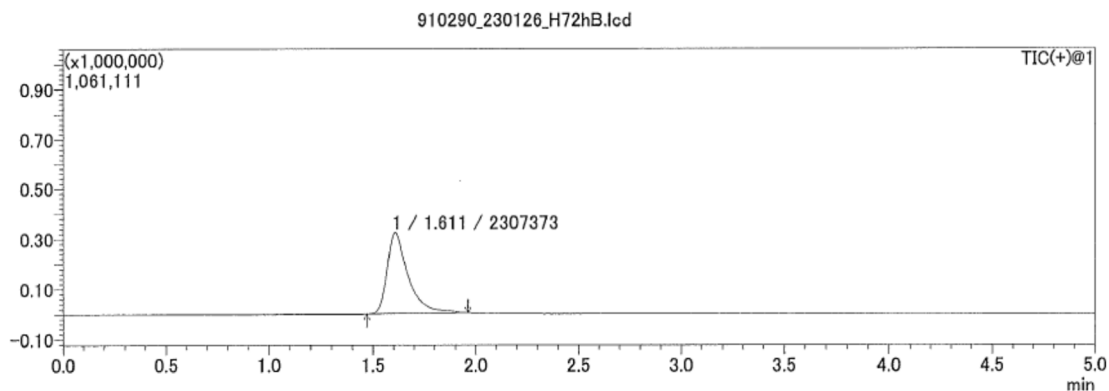


Appendix figure 2-3-2 LC-MS/MS chromatograms at end of exposure.

Sample ID : 910290  
Sample name : 25.0 mg/L exposure level  
Vial number : 9  
Acquisition date : 2023/01/26  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230126\_H72hC.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230124MS17.lcm

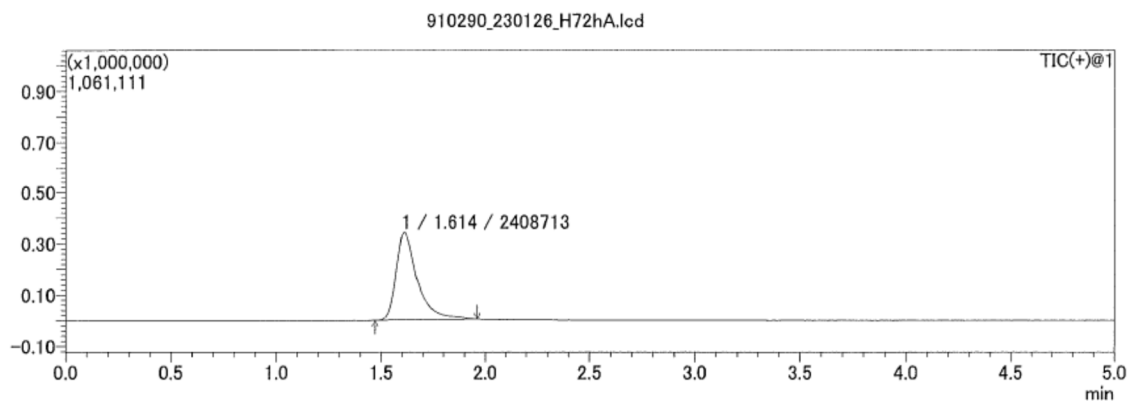


Sample ID : 910290  
Sample name : 50.0 mg/L exposure level  
Vial number : 10  
Acquisition date : 2023/01/26  
Inj. Volume : 1  
Data file : 910290\_230126\_H72hB.lcd  
Method file : 910290\_910292\_mrm\_230124MS17.lcm



Appendix figure 2-3-3 LC-MS/MS chromatograms at end of exposure.

Sample ID	: 910290
Sample name	: 100 mg/L exposure level
Vial number	: 11
Acquisition date	: 2023/01/26
Inj. Volume	: 1
Data file	: 910290_230126_H72hA.lcd
Method file	: 910290_910292_mrm_230124MS17.lcm



Appendix figure 2-3-4 LC-MS/MS chromatogram at end of exposure.



## Additional data

予備試験結果

## 1. 予備試験で用いた供試試料

メサラジン（ロット番号 TPK9174）

## 2. 被験物質の培地への溶解度

被験物質の培地への溶解度は目視で 100 mg/L 以上と判断された。

## 3. 生物予備試験

## 3.1 予備試験 1

連 数 2 連/試験区

初期細胞濃度  $0.5 \times 10^4$  cells/mL

測定法 クロロフィル蛍光測定法

（暴露終了時において 100 mg/L 区で試験液中に懸濁物が確認されたため、生物量測定はクロロフィル蛍光測定法を採用した。なお、バックグラウンド測定用に設置した 100 mg/L の試験液も同様に懸濁物が確認された。）

試験液調製法 100 mg/L（設定）になるように供試試料と培地を混合し、溶解するまで攪拌して試験原液を調製した。この試験原液をそのまま若しくは培地で適宜希釈し、各試験液を調製した。

&lt;試験生物への影響 1&gt;

設定濃度区 (mg/L)	生長速度 (0-3d) に基づく 生長阻害率 (%)
0.100	-3.1
1.00	-2.4
3.20	-2.4
10.0	-1.8
100	37

試験液の状態は、暴露開始時は 100 mg/L 区でごくわずかに黄色澄明、その他の試験濃度区では無色透明であった。暴露終了時は 100 mg/L 区において試験液中に懸濁物が確認された。なお、バックグラウンド測定用に設置した 100 mg/L の試験液も同様に懸濁物が確認された。

## 3.2 予備試験 2

連 数	2 連/試験区
初期細胞濃度	$0.5 \times 10^4$ cells/mL
測定法	クロロフィル蛍光測定法
試験液調製法	100 mg/L (設定) になるように供試試料と培地を混合し、溶解するまで攪拌して試験原液を調製した。この試験原液をそのまま若しくは培地で適宜希釈し、各試験液を調製した。
分 析	試験液中の被験物質濃度の測定を行った。また、藻体への被験物質の取り込み等の有無を確認するため、5.00 mg/L 区については藻体を添加しない試験液についても測定した。なお、暴露終了時において 100 mg/L 区で試験液中に懸濁物が確認されたが、藻体除去として遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) することで懸濁物も同時に除去した。

## &lt;試験生物への影響 2&gt;

設定濃度区 (mg/L)	生長速度 (0-3d) に基づく 生長阻害率 (%)
5.00	-1.6
100	43

## &lt;試験液中の被験物質濃度&gt;

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度%)	
	暴露開始時	暴露終了時
5.00	5.31 (106)	4.20 (84.0)
5.00 (藻体なし)		4.00 (80.0)
100	102 (102)	99.6 (99.6)

藻体吸着: なし

試験液の状態は、暴露開始時は 100 mg/L 区でごくわずかに黄色澄明、5.00 mg/L 区では無色透明であった。暴露終了時は試験液の観察は実施しなかったが、バックグラウンド測定用に設置した 5.00 mg/L の試験液は無色透明であった。

## 4. 本試験条件

試験区	設定濃度として 100、50.0、25.0、12.5、6.25 mg/L (公比 2.0) 及び対照区
初期細胞濃度	$0.5 \times 10^4$ cells/mL
生物量測定	クロロフィル蛍光測定法
濃度分析	暴露開始時及び終了時に実施